

УДК: 616.34

Original Article

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ У КАЗАХСТАНСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Курентай Б.А.¹, Гусмаулемова А.Д.¹, Утупов Т.А.¹, Ауганова Д.Н.¹, Тарлыков П.В.¹, Хамзина С.С.², Мамлин М.А.², Кожамбетов А.М.³, Шалекенов С.Б.², Кулмамбетова Г.Н.¹.

¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», Кургальжинское шоссе 13/5, Астана, Казахстан, 010000

²ТОО «Национальный научный онкологический центр», ул. Керей-Жанибек хандар 3, Астана, Казахстан, 010000

³Школа Медицины Назарбаев Университета, ул. Керей и Жанибек хандар 5/1, Астана, Казахстан, 010000

*kulmambetova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Колоректальный рак является основной причиной смертности от рака во всем мире. Предполагается, что *Fusobacterium nucleatum* играет важную роль в развитии колоректального рака. Существует множество исследований, доказывающих, что *F. nucleatum* оказывает большое влияние на онкогенез колоректального рака, однако участие бактерии в этом процессе остается неясным. Целью нашего исследования было обнаружение *F. nucleatum* в ткани колоректального рака. Был проанализирован биоматериал 43 пациентов с колоректальным раком, полученных из Национального научного онкологического центра. Для обнаружения бактерии из биоматериала была экстрагирована ДНК и параллельно проведен культуральный посев. Детекция *F. nucleatum* проводилась двумя методами с помощью микробиологической идентификации матрично-активированной лазерной десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) и количественной ПЦР в реальном времени. В результате MALDI выявил 14,58%, в то время, как кПЦР обнаружил 46,51% бактерии *F. nucleatum*. Таким образом, *F. nucleatum* потенциально может служить биомаркером риска развития колоректального рака.

Ключевые слова: *Fusobacterium nucleatum*, колоректальный рак, детекция, кПЦР, MALDI, опухоль

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности и вторым по смертности онкозаболеванием в мире. По оценкам, в 2020 году в мире зафиксировано более 1,9 миллиона новых случаев колоректального рака и более 930 000 случаев смерти от данного вида рака [1]. Около 50,3% всех новых случаев КРР приходится на Азию [2]. Ежегодно в Казахстане выявляется более 3000 новых случаев колоректального рака [3].

Появляется все больше доказательств ассоциаций кишечных бактерий с КРР. Во всем мире активно описываются изменения в составе кишечной микробиоты [4] и все большее число исследований обнаруживает, что определенные виды кишечной микробиоты более распространены у людей с КРР по сравнению со здоровыми людьми соответствующих возрастов [5].

В 2012 году две независимые исследовательские группы описали повышенную встречаемость *Fusobacterium nucleatum* в раковой ткани кишечника [6, 7]. С тех пор влияние *F. nucleatum* на развитие или прогрессирование КРР считается обоснованным [6-11].

F. nucleatum стал потенциальным кандидатом на предрасположенность к КРР из-за способности связываться с E-кадгеринном на поверхности клеток толстой кишки с помощью адгезии FadA [12]. Это приводит к активации передачи сигналов Wnt/β-катенинового пути и развитию воспалительного процесса так же, как и онкогенного [13] ответа.

Адгезин Fap2 *F. nucleatum* способствует связыванию с ингибирующим иммунным рецептором TIGIT (иммунный рецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM) и изменяет функцию естественных клеток-киллеров и лимфоцитов, которые участвуют в инфильтрации опухоли [14].

F. nucleatum - грамотрицательная облигатная анаэробная бактерия, обычно обитающая в полости рта [15]. Бактерия считается патогенной, когда участвует в образовании зубного налета, где способна привлекать другие виды бактерий [16]. Бактерии также обнаруживались и в других органах, в том числе в плаценте и тканях плода [17], в головном мозге [18], в печени [19]. У мышей пероральные *Fusobacterium* гематогенно переносились в плаценту, и это было связано с мертворождением [20]. Присутствие *F. nucleatum* в толстой кишке обуславливало воспалительное заболевание кишечника, и это коррелировало с его инвазивным потенциалом [21].

Однако, основные механизмы, которые приводят к прогрессированию канцерогенеза, вызываемого этим видом бактерий, остаются неясными. Было высказано предположение, что *F. nucleatum* может вызывать повреждение эпителиального барьера толстой кишки [22], индуцировать повреждение ДНК клеток слизистой оболочки кишечника [23] или приводить к дисбактериозу кишечной микробиоты тем самым индуцируя микросреду для онкогенеза [24].

Таким образом, целью данного исследования стало обнаружение бактерий *F. nucleatum* в ткани опухоли колоректального рака у казахстанских пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группа пациентов и сбор образцов

Материалом для исследования *Fusobacterium nucleatum* служили образцы тканей опухоли колоректального рака от казахстанских пациентов из Национального научного онкологического центра. Предварительно, от пациентов было получено информированное согласие, одобренное и согласованное с Этической комиссией РГП «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК. После

получения информированного согласия на участие в исследовании, пациент заполнял опросник, на основании которого были собраны анкетные данные пациентов. В исследовании использовалась выборка 43 пациентов после хирургического лечения. Диагностирование биоматериала (биопсия) на колоректальный рак осуществлялось гистологически. Свежие ткани карциномы, соседние нормальные ткани и отдаленные нормальные ткани (на расстоянии 10 см) от каждого пациента включались в выборку согласно критериям включения и исключения. Биоматериалы в количестве были фиксированы и транспортированы в лабораторию в 20% сахарозе в течение 2х часов.

Экстракция ДНК и культивирование изолятов

Экстракция ДНК из ткани опухоли проводили методом высаливания [25]. Качественные и количественные характеристики ДНК определяли спектрофотометрически с помощью NanoDrop 1000. Все образцы ДНК хранились при температуре -20°C.

Культивирование изолятов осуществлялось на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибринированной овечьей крови, витамина K1, гемина и антибиотиков (джозамицин, ванкомицин, неомицин). Посевы инкубировали в анаэробных условиях с использованием GasPak EZGas (Becton Dickinson, артикул 260 683) в течение 72 ч при 37°C.

Идентификация бактерий

Детекцию бактерий с посева проводили с помощью системы микробиологической идентификации матрично-активированной лазерной десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) с применением прибора Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Этот метод применяется в клинической микробиологии для идентификации микроорганизмов. Идентификация микроорганизмов основывалась на получении общего масс-спектра белков в диапазоне 1000-10000 дальтон и биоинформационного сравнения полученного спектра с базой данных референсных спектров с использованием коммерческой базы данных MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). Культуры микроорганизмов (единичные колонии) наносили на ячейки 96-луночного MSP-чипа (MSP 96 target polished steel BC, microScoutTarget). Далее наносили 1 мкл раствора матрицы (насыщенный раствор α-Циано-4-гидроксикоричной кислоты с 50 % содержанием ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты) и высушивали при комнатной температуре. Чип-мишень с нанесенными на него образцами помещали в MALDI-TOF масс-спектрометр. После позиционирования чипа в ионизационной камере и достижения необходимых значений рабочих параметров прибора проводили калибровку с помощью нанесенного калибровочного стандарта. После этого приступали к сбору спектров в автоматическом режиме, устанавливая необходимые параметры. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц). Анализируемый диапазон масса/заряд составлял 2000–20000 Да. В результате масс-спектрометрического анализа образцы были определены с высокой степенью достоверности как бактерии рода *Fusobacterium*. Интересующие нас колонии пересеивали в свежие кровяные среды и ин-

кубировали в термостате. В результате последовательных пересевов очищенные изоляты были идентифицированы посредством ПЦР-амплификации гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров. Амплифицированные продукты анализированы на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) с последующим идентификацией в GeneBank по алгоритму BLAST.

кПЦР в реальном времени

Уникальная последовательность гена *nusG* в *F. nucleatum* была использована в качестве мишени для кПЦР [6]. Последовательность прямого праймера 5'-CA ACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA и обратного праймера 5'-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTA-AAAATC согласно [26]. В качестве внутреннего контроля использовали ген *slco2a1* с прямым праймером 5'-ATCCCCAAAGCACCTGGTTT и обратным праймером 5'-AGAGGCCAAGATAGTCCTGGTAA [26]. Реакцию проводили в 10 μL, содержащий 1 × БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Новосибирск), 0,1 μM каждого праймера в воде, не содержащей нуклеаз (Roche, Penzberg). В качестве матрицы использовали 0,3–100 нг ДНК, выделенной из ткани опухоли. В качестве отрицательного контроля использовали воду, не содержащую нуклеаз, пригодную для ПЦР. Реакции qPCR проводили с помощью CFX384™ Real-Time System (Био-Рад, США), используя следующие условия: денатурация в течение 5 мин при 95°C, 49 циклов при 95°C в течение 10 с, 65°C в течение 10 с и 72°C в течение 15 с, с последующим температурным градиентом от 65 до 95 °C.

Параллельно полученные ампликоны проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле, чтобы подтвердить их длину 112 bp и 74 bp для *nusG* и *slco2a1* соответственно.

Количественные анализы проведены в двух повторностях с дальнейшим применением в расчетах их среднего значения. Количество *Fusobacterium nucleatum* в каждом образце рассчитывали как относительное безразмерное значение, нормализованное на *slco2a1*, используя метод 2-ΔCt (где ΔCt = “среднее значение Ct для *Fusobacterium nucleatum*” - “среднее значение Ct для *slco2a1*”), как описано ранее [27].

Статистика

Все статистические анализы были проведены с использованием программного обеспечения R.Studio версии 4.2.0 с использованием пакетов stats, graphics, datasets. Непрерывные переменные в двух разных группах были исследованы с использованием t-критерия студента и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA соответственно. Значение P < .05 считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группа исследования была представлена в количестве 43 пациента с колоректальным раком из Национального научного онкологического центра. Клинические характеристики, стратифицированные согласно присутствию *F. nucleatum* в ткани КРР, представлены в таблице 1. Относительное количество ДНК *F. nucleatum* в образцах ткани

было измерено посредством анализа кПЦР. Мы не наблюдали значимых ассоциаций между *F. nucleatum* в ткани и раково-эмбриональным антигеном, являющимся маркером карциномы желудочно-кишечного тракта ($P = 0.86$). Наличие *F. nucleatum* в ткани КРР не было статистически значимо ассоциировано с возрастом, полом, локализацией опухоли, размером опухоли, стадией рака, индексом массы тела, диабетом и артериальной гипертензией.

Fusobacterium nucleatum был обнаружен в 20 (46,51 %) из 43 образцов. В то время, как с помощью MALDI бактерия детектирована только в 7 (14,58 %) (Таблица 2). Метод кПЦР имеет высокий процент специфичности и чувствительности. По результатам MALDI *Fusobacterium nucleatum* встречается в образцах с частотой 1:7.

Таблица 1. Сравнение демографических и клинических характеристик пациентов с КРР

| Характеристика | Общий | <i>F. nucleatum</i> | | P-value |
|------------------------------|-------|---------------------|---------------|---------|
| | | Отрицательный | Положительный | |
| Возраст (годы) | 58.42 | 55.2 | 62.05 | 0.06006 |
| ИМТ | 26.35 | 25.4 | 26.89 | 0.4926 |
| Пол | | | | 0.616 |
| М | 19 | 13 | 6 | |
| Ж | 24 | 16 | 8 | |
| Алкоголь | | | | 0.3282 |
| Пьющие | 1 | 1 | 0 | |
| Непьющие | 42 | 22 | 20 | |
| Курение 0.8584 | | | | |
| Когда-либо | 6 | 3 | 3 | |
| Никогда | 37 | 20 | 17 | |
| Диабет 0.378 | | | | |
| Да | 9 | 6 | 3 | |
| Нет | 34 | 23 | 11 | |
| Гипертензия | | | | 0.955 |
| Да | 17 | 11 | 6 | |
| Нет | 26 | 18 | 8 | |
| Стадия 0.2871 | | | | |
| Стадия I | 1 | 0 | 1 | |
| Стадия II | 9 | 5 | 4 | |
| Стадия III | 27 | 16 | 12 | |
| Стадия IV | 5 | 3 | 2 | |
| Локализация КРР; n(%) 0.7825 | | | | |
| Проксимальный отдел | 12 | 6 | 6 | |
| Дистальный отдел | 31 | 17 | 14 | |

Таблица 2. Распространенность *F. nucleatum* в пациентах с колоректальным раком

| Метод детекции | Количество пациентов | Процент обнаружения <i>F. nucleatum</i> | Тип образца |
|----------------|----------------------|---|-------------|
| кПЦР | 43 | 46,51 | гДНК |
| MALDI | 48 | 14,58 | культура |

По результатам MALDI был анализирован микробный состав анаэробных бактерий в исследуемых образцах ткани КРР (Таблица 3). Часто встречающейся является *E.coli* 85,42 %, в то время как частота встречаемости *F.nucleatum* 14,5% (Рисунок 1). Кроме *F.nucleatum* в кишечной микрофлоре пациентов с КРР реже встречаются и другие подвиды *Fusobacterium*, такие как *F.varium*, *F.necrophorum*, *F.periodonticum*, *F.naviforme*. В то же время подвиды *Citrobacter*, такие как *C.farmeri*, *C.koseri*, *C.amalonaticus* встречаются с частотой 56,25%, 52.08%, 43.75% соответственно.

В то же время относительная количественная оценка ДНК *F. nucleatum*, нормализованная по эталонному гену демонстрирует не значимое различие по статусу наличия

Таблица 3. Частота встречаемости бактерий в ткани опухоли КРР по данным MALDI

| Вид бактерий | Количество | Проценты, % | Вид бактерий | Количество | Проценты, % |
|--|------------|-------------|---|------------|-------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 9 | 18,75 | <i>Fusobacterium varium</i> | 1 | 2,08 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 5 | 10,42 | <i>Fusobacterium necrophorum</i> | 1 | 2,08 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 8 | 16,67 | <i>Fusobacterium periodonticum</i> | 1 | 2,08 |
| <i>Bacteroides faecis</i> | 4 | 8,33 | <i>Klebsiella variicola</i> | 7 | 14,58 |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | 21 | 43,75 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 9 | 18,75 |
| <i>Citrobacter farmeri</i> | 27 | 56,25 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> | 15 | 31,25 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 25 | 52,08 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i> | 14 | 29,17 |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> | 14 | 29,17 | <i>Kosakonia cowanii</i> | 12 | 25,00 |
| <i>Escherichia coli</i> | 41 | 85,42 | <i>Morganella morganii</i> | 4 | 8,33 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | 7 | 14,58 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4 | 8,33 |
| <i>Escherichia fergusonii</i> | 18 | 37,50 | <i>Pluralibacter pyrinus</i> | 4 | 8,33 |
| <i>Escherichia albertii</i> | 18 | 37,50 | <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 15 | 31,25 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 9 | 18,75 | <i>Salmonella sp (enterica st Dublin)</i> | 6 | 12,50 |
| <i>Enterobacter kobei</i> | 8 | 16,67 | <i>Salmonella sp (choleraesuis)</i> | 7 | 14,58 |
| <i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i> | 12 | 25,00 | <i>Streptococcus anginosus</i> | 4 | 8,33 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 7 | 14,58 | <i>Veillonella parvula</i> | 6 | 12,50 |
| <i>Fusobacterium naviforme</i> | 2 | 4,17 | <i>Veillonella dispar</i> | 5 | 10,42 |

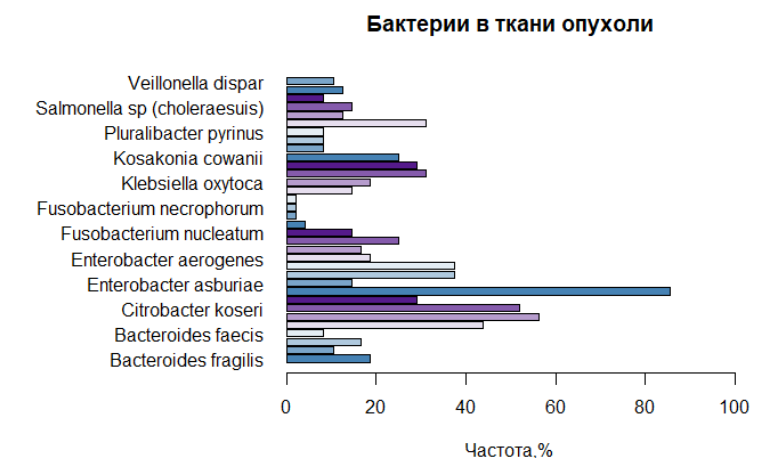


Рисунок 1. Частота встречаемости бактерий в ткани опухоли КРР.

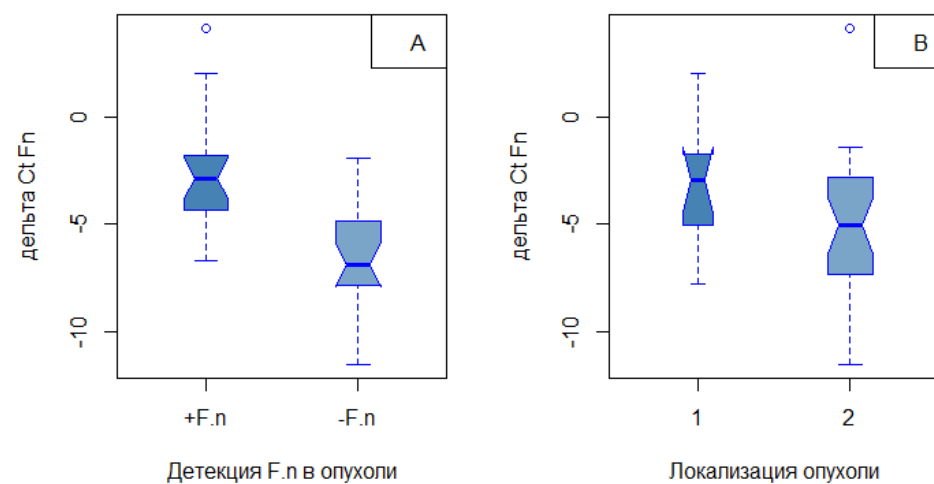


Рисунок 2. Относительное количество *F. nucleatum* в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком. На графике показаны медиана и межквартильный диапазон относительных количественных показателей *F. nucleatum*. А. +F.n положительный статус наличия бактерии, F.n отрицательный статус наличия бактерии. В. 1 - Проксимальный отдел толстого кишечника, 2- Дистальный отдел толстого кишечника.

бактерии и локализации опухоли ($P = 0,23$, $P = 0,35$) соответственно (рисунок 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании изучали распространенность *F. nucleatum* у 43 пациентов с колоректальным раком разными молекулярными методами. В исследовании использовались два метода детекции; количественный реал-тайм ПЦР, MALDI. Масс-спектрометрия представляет собой метод химического анализа, который использует для измерения массы неизвестных молекул ионизации, разделения и обнаружения ионов в соответствии с их отношением массы к заряду (разделяя их на положительные и отрицательные ионы). А данные регистрируют в виде масс-спектров. Несмотря на то, что система является «фенотипической», она, в некотором смысле, устраняет пробел в достоверности результатов испытаний, полученных с помощью биохимических систем фенотипирования и идентификационных систем генотипирования. Результаты детекции бактерии посредством количественного реал-тайм ПЦР продемонстрировал более высокую чувствительность в сравнении с MALDI 46,51% и 14,58% соответственно [28].

В литературных сообщениях существуют различные значения в частоте обнаружения *F. nucleatum* из биоматериала пациентов. Например, исследование Li et al. (2016) методами флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) и количественной флуоресцентной ПЦР (QF-PCR) выявило 87,13% распространенности *F. nucleatum* в фиксированных в формалине парафинизированных образцах (FFPE) и замороженных тканях. Результаты показали, что *F. nucleatum* был сконцентрирован в тканях КРР и распространенность *F. nucleatum* была положительно связана с метастазами в лимфатические узлы у пациентов с КРР. При этом географических и этнических различий в ассоциации не наблюдалось [29]. Японские исследователи для детекции *F. nucleatum* провели кПЦР и цифровую капельную ПЦР, где были использованы FFPE – образцы и за-

мороженные ткани соответственно. Распространенность *F. nucleatum* составила 56% и 75%, соответственно. Повышенное количество *F. nucleatum* в тканях КРР положительно коррелирует с размером опухоли и коротким временем выживания, в то же время *F. nucleatum* служит как прогностический маркер для IV стадии КРР. Также есть предположение, что присутствие *F. nucleatum* может увеличиваться в зависимости от гистологической степени и может способствовать прогрессированию колоректальной неоплазии [30, 31]. Два независимых исследования в США обнаружили *F. nucleatum* в 13% и 48% методом кПЦР, в первом исследовании использовали FFPE – образцы, во втором были использованы свежие ткани. Детектируемое количество ДНК бактерии в данных исследованиях было ассоциировано со смертностью от КРР, также результаты показывают, что повышенное содержание видов *Fusobacterium* в микробиоте кишечника может быть общей особенностью онкогенеза толстой кишки [27, 32]. По результатам совместных работ американских и японских коллег было выявлено, что высокое содержание бактерии ассоциируется со специфичными молекулярными характеристиками КРР, в том числе тип рака с высокой степенью метилирования CpG-островков и высокой частотой мутаций в целом, кроме гена TP53 [33]. Наши данные демонстрируют распространенность *F. nucleatum* в тканях КРР 46,52% (20/43), (Таблица 1) значимой ассоциации с клиническими характеристиками выявлено не было. Различия между исследованиями обусловлены методом обнаружения и характером образцов.

Присутствие *F. nucleatum* указывает на прогрессирование злокачественной трансформации. *F. nucleatum*, возможно, действует как ключевой фактор инициации расстройств, подразумевая, что эта бактерия может быть полезным ранним биомаркером развития КРР.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования подтверждают, что процент выявления бактерии разными методами аналогично с ра-

нее проведенными работами доказывает, что присутствие *F. nucleatum* в тканях КРР может служить предпосылкой для выявления бактериального фактора риска онкогенеза. Эти результаты позволяют предположить, что определение уровней *F. nucleatum* может помочь предсказать клинические исходы у пациентов с колоректальным раком. Для подтверждения наших выводов необходимы дальнейшие проспективные исследования с использованием независимых наборов данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP14869820).

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. Colorectal cancer // Retrieved from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer#:~:text=Colon%20cancer%20is%20the%20second,and%20mortality%20rates%20were%20observed>.
- Mauyenova D., Zhadykova Y., Khozhayev A., Turebayev D., Kulmirzayeva D., Urazova S., Nurtazinova G., Kuandykov Y., Amanshayeva A., Sakhanov S., Bukeyeva Z., Openko V., Orazbayev S., Kozhakhmetov S., Bilyalova Z., Iqissinova G., Alireza Mosavi Jarrahi A., Iqissinov N. Trends of Colorectal Cancer Incidence in Kazakhstan // Asian Pac J Cancer Prev. - 2021. - Vol. 22, No. 10. - P. 3405. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.10.3405. PMID: 34714614; PMID: PMC8858261.
- Amankulov J., Kaidarova D., Zholdybay Z., Zagurovskaya M., Baltabekov N., Gabdullina M., Ainakulova A., Toleshbayev D., Panina A., Satbayeva E., Kalieva Z. Colorectal Cancer Screening with Computed Tomography Colonography: Single Region Experience in Kazakhstan // Clin Endosc. - 2022. Vol. 55, No. 1. - P. 101-112. doi: 10.5946/ce.2021.066. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34265195; PMID: PMC8831409.
- Kaminski M.F., Robertson D.J., Senore C., Rex D.K. Optimizing the Quality of Colorectal Cancer Screening Worldwide // Gastroenterology. - 2020. Vol. 158. - P. 404. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.026. PMID: 31759062
- Sánchez-Alcoholado L., Ramos-Molina B., Otero A., Laborda-Illanes A., Ordóñez R., Medina J.A., Gómez-Millán J., Queipo-Ortuño M.I. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response // Cancers (Basel). - 2020. - Vol. 29, No. 6. - P. 1406. doi: 10.3390/cancers12061406. PMID: 32486066; PMID: PMC7352899.
- Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D., et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma // Genome Research. - 2012. Vol. 22, No. 2. - P. 299–306. doi: 10.1101/gr.126516.111. PMID: 22009989; PMID: PMC3266037
- Kostic A.D., Gevers D., Pedamallu C.S., Michaud M., Duke F., Earl A.M., Ojesina A.I., Jung J., Bass A.J., Tabernero J., Baselga J., Liu C., Shivdasani R.A., Ogino S., Birren B.W., Huttenhower C., Garrett W.S., Meyerson M. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorec-

tal carcinoma // Genome Res. - 2012. Vol. 22, No. 2. - P. 292–298. doi: 10.1101/gr.126573.111. PMID: 22009990; PMID: PMC3266036.

8. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y.W. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin // Cell Host Microbe. - 2013. Vol. 14, No. 2. - P. 195–206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012. PMID: 23954158; PMID: PMC3770529.

9. Rubinstein M.R., Baik J.E., Lagana S.M., Han R.P., Raab W.J., Sahoo D., Dalerba P., Wang T.C., Han Y.W. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer by inducing Wnt/β-catenin modulator Annexin A1 // EMBO Rep. - 2019. Vol. 20, No. 4. - P. e47638. doi: 10.15252/embr.201847638. Epub 2019 Mar 4. PMID: 30833345; PMID: PMC6446206.

10. Kostic A.D., Chun E., Robertson L., Glickman J.N., Gallini C.A., Michaud M., Clancy T.E., Chung D.C., Lochhead P., Hold G.L., ElOmar E.M., Brenner D., Fuchs C.S., Meyerson M., Garrett W.S. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment // Cell Host Microbe. - 2013. Vol. 14, No. 2. - P. 207–215. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007. PMID: 23954159; PMID: PMC3772512.

11. Mima K., Nishihara R., Qian Z.R., Cao Y., Sukawa Y., Nowak J.A., Yang J., Dou R., Masugi Y., Song M., Kostic A.D., Giannakis M., Bullman S., Milner D.A., Baba H., Giovannucci E.L., Garraway L.A., Freeman G.J., Dranof G., Garrett W.S., Huttenhower C., Meyerson M., Meyerhardt J.A., Chan A.T., Fuchs C.S., Ogino S. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis // Gut. - 2016. Vol. 65, No. 12. - P. 1973–1980. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310101. PMID: 26311717; PMID: PMC4769120.

12. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin // Cell Host Microbe. - 2013. - Vol. 14, No. 2. - P. 195–206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012. PMID: 23954158; PMID: PMC3770529.

13. Rubinstein M.R., Baik J.E., Lagana S.M., Han R.P., Raab W.J., Sahoo D., Dalerba P., Wang T.C., Han Y.W. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer by inducing Wnt/β-catenin modulator Annexin A1 // EMBO Rep. - 2019. Vol. 20. - P. e47638. doi: 10.15252/embr.201847638. PMID: 30833345; PMID: PMC6446206.

14. Brennan C.A., Garrett W.S. Fusobacterium nucleatum—symbiont, opportunist and oncobacterium // Nat. Rev. Genet. - 2018. Vol. 17. - P. 156–166. doi: 10.1038/s41579-018-0129-6. PMID: 30546113; PMID: PMC6589823.

15. Brennan C.A., Garrett W.S. Fusobacterium nucleatum – symbiont, opportunist and oncobacterium // Nat Rev Microbiol. - 2019. Vol. 17, No. 3. - P. 156–166. doi: 10.1038/s41579-018-0129-6. PMID: 30546113; PMID: PMC6589823.

16. Bradshaw D.J., Marsh P.D., Watson G.K., Allison C. Role of Fusobacterium nucleatum and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration // Infect Immunol. - 1998. Vol. 66, No. 10. - P. 4729–4732. doi: 10.1128/IAI.66.10.4729-4732.1998. PMID: 9746571; PMID: PMC10858

17. Han Y.W., Fardini Y., Chen C., Iacampo K.G., Peraino V.A., Shamonki J.M., Redline R.W. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*//Obstet Gynecol. - 2010. Vol. 115, No. 2. - P. 442–445. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181cb9955. PMID: 20093874; PMCID: PMC3004155.
18. Kai A., Cooke F., Antoun N., Siddharthan C., Sule O. A rare presentation of ventriculitis and brain abscess caused by *Fusobacterium nucleatum* // J Med Microbiol. - 2008. Vol. 57, No. 5. - P. 668–671. doi: 10.1099/jmm.0.47710-0. PMID: 18436604.
19. Yoneda M., Kato S., Mawatari H., Kirikoshi H., Imajo K., Fujita K., Endo H., Takahashi H., Inamori M., Kobayashi N., Kubota K., Saito S., Tohnai I., Watanuki K., Wada K., Maeda S., Nakajima A. Liver abscess caused by periodontal bacterial infection with *Fusobacterium necrophorum* //Hepatol Res. - 2011. Vol. 41, No. 2. - P. 194–196. doi: 10.1159/000356821. PMID: 24348321; PMCID: PMC3843899
20. Han Y.W., Redline R.W., Li M., Yin L., Hill G.B., McCormick T.S. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth //Infect Immunol. - 2004. Vol. 72, No. 4. - P. 2272–2279. doi: 10.1128/IAI.72.4.2272-2279.2004. PMID: 15039352; PMCID: PMC375172.
21. Strauss J., Kaplan G.G., Beck P.L., Rioux K., Panaccione R., Devinney R., Lynch T., Allen-Vercoe E. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host // Inflamm Bowel Dis. - 2011. Vol. 17, No. 9. - P. 1971–1978. doi: 10.1002/ibd.21606. PMID: 21830275.
22. Liu H., Hong X.L., Sun T.T., Huang X.W., Wang J.L., Xiong H. *Fusobacterium nucleatum* exacerbates colitis by damaging epithelial barriers and inducing aberrant inflammation//J Dig Dis. - 2020. Vol. 21, No. 7. - P. 385–398. doi: 10.1111/1751-2980.12909. PMID: 32441482.
23. Li R., Shen J., Xu Y. *Fusobacterium nucleatum* and Colorectal Cancer // Infect Drug Resist. - 2022. Vol. 17, No. 15. - P. 1115–1120. doi: 10.2147/IDR.S357922. PMID: 35321079; PMCID: PMC8937307.
24. Ahmad Kendong S.M., Raja Ali R.A., Nawawi K.N.M., Ahmad H.F., Mokhtar N.M. Gut dysbiosis and intestinal barrier dysfunction: potential explanation for early-onset colorectal cancer//Front Cell Infect Microbiol. - 2021. Vol. 11. - P. e744606. doi: 10.3389/fcimb.2021.744606. PMID: 34966694; PMCID: PMC8710575.
25. Nasiri H., Forouzandeh M., Rasaei M.J., Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent // J Clin Lab Anal. - 2005. Vol. 19, No. 6. - P. 229–32. doi: 10.1002/jcla.20083. PMID: 16302208; PMCID: PMC6808030.
26. Mima K., Sukawa Y., Nishihara R., Qian Z.R., Yamachi M., Inamura K., Kim S.A., Masuda A., Nowak J.A., Noshok K., Kostic A.D., Giannakis M., Watanabe H., Bullman S., Milner D.A., Harris C.C., Giovannucci E., Garraway L.A., Freeman G.J., Dranof G., Chan A.T., Garrett W.S., Huttenhower C., Fuchs C.S., Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* and T cells in colorectal carcinoma // JAMA Oncol. - 2015. Vol. 1, No. 5. - P. 653–661. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1377. PMID: 26181352; PMCID: PMC4537376.
27. Mima K., Cao Y., Chan A. T., Qian Z. R., Nowak J. A., Masugi Y., Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location // Clinical and Translational Gastroenterology. - 2016. Vol. 7, No. 11. - P. e200. doi: 10.1038/ctg.2016.53. PMID: 27811909; PMCID: PMC5543402.
28. Abd El-Aziz N.K., Gharib A.A., Mohamed E.A.A., Hussein A.H. Real-time PCR versus MALDI-TOF MS and culture-based techniques for diagnosis of bloodstream and pyogenic infections in humans and animals // J Appl Microbiol. - 2021. Vol. 130, No. 5. - P. 1630–1644. doi: 10.1111/jam.14862. Epub 2020 Oct 18. PMID: 33073430.
29. Li Y.Y., Ge Q.X., Cao J., Zhou Y.J., Du Y.L., Shen B., Nie Y.Q. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients // World Journal of Gastroenterology. - 2016. Vol. 22, No. 22. - P. e3227. doi: 10.3748/wjg.v22.i11.3227. PMID: 27004000; PMCID: PMC4789998.
30. Ito M., Kanno S., Noshok K., Sukawa Y., Mitsuhashi K., Kurihara H., Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway // International Journal of Cancer. - 2015. Vol. 137, No. 6. - P. 1258–1268. doi: 10.1002/ijc.29488. PMID: 25703934.
31. Yamaoka Y., Suehiro Y., Hashimoto S., Hoshida T., Fujimoto M., Watanabe M., Yamasaki T. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population//Journal of Gastroenterology. - 2018. Vol. 53, No. 4. - P. 517–524. doi: 10.1007/s00535-017-1382-6. PMID: 28823057.
32. Kostic A. D., Chun E., Robertson L., Glickman J. N., Gallini C. A., Michaud M., Garrett, W. S. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment // Cell Host & Microbe. - 2013. Vol. 14, No. 2. - P. 207–215. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007. PMID: 23954159; PMCID: PMC3772512.
33. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano H, Sugai T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estécio M, and Issa J. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 2014 March 1; 74(5): 1311–1318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1865.

REFERENCES

itively correlates with IBD status of the host // *Inflamm Bowel Dis.* - 2011. Vol. 17, No. 9. - P. 1971–1978. doi: 10.1002/ibd.21606. PMID: 21830275.

22. Liu H., Hong X.L., Sun T.T., Huang X.W., Wang J.L., Xiong H. *Fusobacterium nucleatum* exacerbates colitis by damaging epithelial barriers and inducing aberrant inflammation // *J Dig Dis.* - 2020. Vol. 21, No. 7. - P. 385–398. doi: 10.1111/1751-2980.12909. PMID: 32441482.

23. Li R., Shen J., Xu Y. *Fusobacterium nucleatum* and Colorectal Cancer // *Infect Drug Resist.* - 2022. Vol. 17, No. 15. - P. 1115–1120. doi: 10.2147/IDR.S357922. PMID: 35321079; PMCID: PMC8937307.

24. Ahmad Kendong S.M., Raja Ali R.A., Nawawi K.N.M., Ahmad H.F., Mokhtar N.M. Gut dysbiosis and intestinal barrier dysfunction: potential explanation for early-onset colorectal cancer // *Front Cell Infect Microbiol.* - 2021. Vol. 11. - P. e744606. doi: 10.3389/fcimb.2021.744606. PMID: 34966694; PMCID: PMC8710575.

25. Nasiri H., Forouzandeh M., Rasaei M.J., Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent // *J Clin Lab Anal.* - 2005. Vol. 19, No. 6. - P. 229–32. doi: 10.1002/jcla.20083. PMID: 16302208; PMCID: PMC6808030.

26. Mima K., Sukawa Y., Nishihara R., Qian Z.R., Yamachi M., Inamura K., Kim S.A., Masuda A., Nowak J.A., Noshio K., Kostic A.D., Giannakis M., Watanabe H., Bullman S., Milner D.A., Harris C.C., Giovannucci E., Garraway L.A., Freeman G.J., Dranof G., Chan A.T., Garrett W.S., Huttenhower C., Fuchs C.S., Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* and T cells in colorectal carcinoma // *JAMA Oncol.* - 2015. Vol. 1, No.5. - P. 653–661. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1377. PMID: 26181352; PMCID: PMC4537376.

27. Mima K., Cao Y., Chan A. T., Qian Z. R., Nowak J. A., Masugi Y., Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location // *Clinical and Translational Gastroenterology.* - 2016. Vol. 7, No. 11. - P. e200. doi: 10.1038/ctg.2016.53. PMID: 27811909; PMCID: PMC5543402.

28. Abd El-Aziz N.K., Gharib A.A., Mohamed E.A.A., Hussein A.H. Real-time PCR versus MALDI-TOF MS and culture-based techniques for diagnosis of bloodstream and pyogenic infections in humans and animals // *J Appl Microbiol.* - 2021. Vol. 130, No. 5. - P. 1630–1644. doi: 10.1111/jam.14862. Epub 2020 Oct 18. PMID: 33073430.

29. Li Y.Y., Ge Q.X., Cao J., Zhou Y.J., Du Y.L., Shen B., Nie Y.Q. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients // *World Journal of Gastroenterology.* - 2016. Vol. 22, No. 22. - P. e3227. doi: 10.3748/wjg.v22.i11.3227. PMID: 27004000; PMCID: PMC4789998.

30. Ito M., Kanno S., Noshio K., Sukawa Y., Mitsuhashi K., Kurihara H., Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway // *International Journal of Cancer.* - 2015. Vol. 137, No. 6. - P. 1258–1268. doi: 10.1002/ijc.29488. PMID: 25703934.

31. Yamaoka Y., Suehiro Y., Hashimoto S., Hoshida T., Fujimoto M., Watanabe M., Yamasaki T. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population // *Journal of Gastroenterology.* - 2018. Vol. 53, No. 4. - P. 517–524. doi: 10.1007/s00535-017-1382-6. PMID: 28823057.

32. Kostic A. D., Chun E., Robertson L., Glickman J. N., Gallini C. A., Michaud M., Garrett W. S. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment // *Cell Host & Microbe.* - 2013. Vol. 14, No. 2. - P. 207–215. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007. PMID: 23954159; PMCID: PMC3772512.

33. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano H, Sugai T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estécio M, and Issa J. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 2014 March 1; 74(5): 1311–1318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1865.

UDC: 616.34

MOLECULAR DETECTION OF *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* IN IN KAZAKHSTANY PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Kurentay B.A¹, Gusmaulemova A.D¹, Utupov T.A¹, Auganova D.N¹, Tarlykov P.V¹, Khamzina S.S², Mamlin M.A², Kozhakhmetov A.M³, Shalekenov S.B², Kulmambetova G.N^{1*}.

¹LLP «National Center for Biotechnology», Korgalzhyn highway 13/5, Astana, Kazakhstan, 010000

²LLP «National Scientific Cancer Center», Kerey, Zhanibek Khandar str., house 3, Astana, Kazakhstan, 010000

³Nazarbayev University School of Medicine, Kerey, Zhanibek Khandar str., house 5/1, Astana, Kazakhstan, 010000

*kulmambetova@biocenter.kz

ABSTRACT

Colorectal cancer is the leading cause of cancer death worldwide. *Fusobacterium nucleatum* is thought to play an important role in the development of colorectal cancer. *F. nucleatum* there are many studies that prove that has a great influence on the oncogenesis of colorectal cancer, but the participation of the bacterium in this process remains unclear. The goal of our study is to find out in colorectal cancer tissue *F. nucleatum* was the definition. Biomaterials from 43 colorectal cancer patients from the National scientific cancer center were analyzed. To detect bacteria, DNA was extracted from the biomaterial and culture inoculation was carried out in parallel. *F. nucleatum* detection was performed by two methods using Matrix activated laser microbiological desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and quantitative real-time PCR detection. As a result, MALDI determined 14.58%, and qPCR detected 46.51% of bacteria. Thus, *F. nucleatum* can be a biomarker of colorectal cancer risk.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*, colorectal cancer, detection, qPCR, MALDI, tumor

ӘОЖ: 616.34

FUSOBACTERIUM NUCLEATUM - НЫҢ ҚАЗАҚСТАНДЫҚ ПАЦИЕНТТЕРДЕ ТОҚ ІШЕК ІСІГІНІҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ ДЕТЕКЦИЯСЫ

Курентай Б.А¹, Гусмаулемова А.Д¹, Утупов Т.А¹, Ауганова Д.Н¹, Тарлыков П.В¹, Хамзина С.С², Мамлин М.А², Кожажметов А.М³, Шалекенов С.Б², Кулмамбетова Г.Н^{1*}.

¹ТОО «Ұлттық биотехнология орталығы», Қорғалжын шоссесі 13/5, Астана, Қазақстан, 010000

²ТОО «Ұлттық ғылыми онкологиялық орталығы», Керей-Жанібек хандар 3 көшесі, Астана, Қазақстан, 010000

³Назарбаев Университетінің Медицина мектебі, Керей-Жанібек хандар 5/1 көшесі, Астана, Қазақстан, 010000

*kulmambetova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Колоректальды қатерлі ісік бүкіл әлемде қатерлі ісік өлімінің негізгі себебі болып табылады. *Fusobacterium nucleatum* колоректальды қатерлі ісіктің дамуында маңызды рөл атқарады деп болжануда. *F. nucleatum* колоректальды қатерлі ісіктің онкогенезіне үлкен әсер ететінін дәлелдейтін көптеген зерттеулер бар, бірақ бактерияның бұл процеске қатысуы түсініксіз болып қалады. Біздің зерттеуіміздің мақсаты колоректальды қатерлі ісік тінде *F. nucleatum* анықтау болды. Ұлттық ғылыми онкологиялық орталықтан алынған колоректальды қатерлі ісікпен ауыратын 43 науқастың биоматериалы талданды. Бактерияларды анықтау үшін биоматериалдан ДНҚ алынды және культура егу қатар жүргізілді. *F. nucleatum* детекциясы матрицалық белсендірілген лазерді микробиологиялық десорбция/иондану ұшу уақытының масс-спектрометриясымен (MALDI-TOF MS) және нақты уақыттағы сандық ПТР анықтау арқылы екі әдіспен жүргізілді. Нәтижесінде MALDI 14,58% анықтады, ал сПТР *F. nucleatum* бактериясының 46,51% анықтады. Осылайша, *F. nucleatum* колоректальды қатерлі ісік қаупінің биомаркері бола алады.

Негізгі сөздер: *Fusobacterium nucleatum*, колоректальды қатерлі ісік, детекция, сандық ПТР, MALDI, ісік